

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-075552

(43)Date of publication of application : 05.04.1988

(51)Int.Cl.

G01N 27/30
C12N 11/04
G01N 27/46
// A61B 5/14

(21)Application number : 61-218066

(71)Applicant : TAKEDA MEDICAL:KK

(22)Date of filing : 18.09.1986

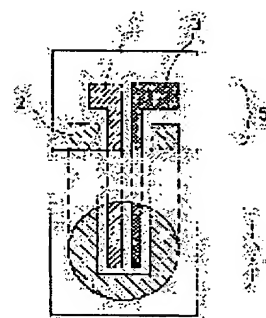
(72)Inventor : NOZOE YOSHITERU
KARUBE MASAO

(54) SIMPLE ENZYME ELECTRODE

(57)Abstract:

PURPOSE: To decrease measurement errors and to provide the titled electrode which is small in size and is suitable for mass production by forming an enzyme immobilized film of a photosensitive resin contg. enzyme and providing a high-polymer film of a photosetting resin, etc., to constitute an enzyme immobilized part.

CONSTITUTION: A working electrode 1, a reference electrode 3 and a counter electrode 2 are provided on a substrate. A sensing part 4 and an external connecting part 5 are separated by an insulating part. The enzyme immobilized enzyme on the working electrode 1 of the sensing part 4 and the high-polymer film 7 is formed by using a two-part or one part type cold setting resin, photosetting resin, etc., is formed thereon. For example, a liquid to be examined receives the limitation by the high-polymer film 7 and arrives at the enzyme immobilized film 6 when said liquid is dropped to the sensing part 4 in the case of the film 6 consisting of glucose oxidase. The glucose is then oxidized to gluconic actone and O₂ is reduced to H₂O₃. The glucose concn. is measured of the current of the working electrode at this time. Since the enzyme immobilized film and high-polymer film are formed by a photolithographic technique, the films are easily formed.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-75552

⑤ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和63年(1988)4月5日
G 01 N 27/30		J-7363-2G	
C 12 N 11/04		7329-4B	
G 01 N 27/46		M-7363-2G	
// A 61 B 5/14	3 1 0	7916-4C	審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 簡易酵素電極

⑯ 特 願 昭61-218066

⑰ 出 願 昭61(1986)9月18日

⑱ 発 明 者 野 添 由 照 東京都板橋区志村2丁目16番20号 株式会社タケダメディカル内

⑲ 発 明 者 軽 部 征 夫 東京都立川市富士見町4丁目11番18号

⑳ 出 願 人 株式会社 タケダメデイカル 東京都板橋区志村2丁目16番20号

㉑ 代 理 人 弁理士 舟橋 榮子

明 細 書

1. 発明の名称

簡易酵素電極

2. 特許請求の範囲

1) 基板上に極を構成する感応部と、電極と測定器本体とを電気的に接続する接続部と、感応部の領域を制限し感応部と接続部間を外部と絶縁する絶縁体でおおわれた絶縁部から成る電極と、

感応部において、酵素固定化膜、さらにこの酵素固定化膜をおおうように高分子膜を配し、酵素固定化膜が、酵素を含んだ感光性樹脂を用いたフォトリソグラフィ技術によって作成され、および高分子膜が、光硬化性樹脂あるいは二液性または一液性の常温硬化性樹脂で印刷、あるいは感光性樹脂でフォトリソグラフィ技術によって作成された酵素固定化部と、

2) 感応部の極を、基板上の同一平面上に作用極、対極および参照極の3極から構成し、感

応部の少なくとも作用極上の一部を、酵素固定化膜とこれをおおう高分子膜を配した酵素固定化部で構成した特許請求の範囲第1項記載の簡易酵素電極。

3) 感応部の極を、基板上の同一平面上に陽極および陰極の2極から構成し、感応部の少なくとも陽極上の一部を、酵素固定化膜とこれをおおう高分子膜を配した酵素固定化部で構成した特許請求の範囲第1項記載の簡易酵素電極。

4) 電極素材が、カーボン粉末、あるいは銀粉末を含んだ導電性印刷インクを用いた印刷によって作成された特許請求の範囲第1項、第2項または第3項記載の簡易酵素電極。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、簡易酵素電極に関し、酵素センサー、例えば血液中や尿中のグルコース濃度測定用の簡易型グルコースセンサー等に用いることができる簡易酵素電極に関するものである。

(従来の技術とその問題点)

特開昭63-75552(2)

酵素センサー、例えばグルコースセンサーを目的別に分類すると、臨床検査機器への組み込みを目指したもの、簡易グルコース計を目指したもの、人工臓器への組み込みを目指したものなどが挙げられる。臨床検査機器へ組み込まれたグルコースセンサーは、すでに市販品もあり、その特徴として、小量生産のため量産性は高くないが、測定回数を多くするため、酵素固定化し、酵素再利用を計っていること、また被検液の希釈、血球分離、標準液による校正、恒温槽の利用など、臨床検査機の装備充実によりセンサーに対する設計の規制が少ないことが挙げられる。

簡易グルコース計に関しては、使い捨て、家庭用による使い良さを意図するため、精度は臨床検査機器用ほど必要ではないが、被検液の希釈や校正が実質的に出来ないなど使用条件が厳しく、センサー間の測定誤差の少ないかつ、量産性の高いものでなければならない。

簡易グルコース計用として、現在主流になっているものは、グルコースオキシダーゼ、パーオキ

シダーゼ、色素を試験紙に組み入れ、グルコース濃度による色調変化を、目視あるいは測定器で検出する比色法を用いたものである。これは、被検液中の色素、例えば赤血球などにより測定誤差を生み、精度誤差が大きく、一度つけた被検液を一定時間後に測定者が拭き取るなど、取扱も容易とは言えない。

一方、ドライケミストリーでは、比色法の精度向上が計られ、臨床検査方面で応用されているが、正確な被検液量が必要で、簡易型としてみた場合、一検体あたりの測定時間が長い、被検部恒温化、複雑な検出光学系など、測定器が大掛かりになっている。

本発明の目的は、測定誤差が少なく、取扱が容易で、簡易型の酵素センサー等に用いられるように、小型で量産できる簡易酵素電極を提供することである。

(問題点を解決するための手段)

本発明は、基板上に極を構成する感応部と、電極と測定器本体とを電気的に接続する接続部と、

- 3 -

感応部の領域を制限し感応部と接続部間を外部と絶縁する絶縁体でおおわれた絶縁部とから成る電極と、前記感応部において、酵素固定化膜、さらにこの酵素固定化膜をおおように高分子膜を配し、酵素固定化膜が、酵素を含んだ感光性樹脂を用いたフォトリソグラフィ技術によって作成され、および高分子膜が、光硬化性樹脂あるいは二液性または一液性の常温硬化性樹脂で印刷、あるいは感光性樹脂でフォトリソグラフィ技術によって作成された酵素固定化部とで構成したことを特徴とする簡易酵素電極である。

感応部の極は、基板上の同一平面上に作用極、対極および参照極の3極から構成し、あるいは陽極および陰極の2極から構成することができる。

感応部は、少なくとも作用極上の一部、または少なくとも陽極上の一部を酵素固定化膜とこれをおおふ高分子膜を配した酵素固定化部で構成することができる。

電極素材は、カーボン粉末、あるいは銀粉末を含んだ導電性印刷インクを用いた印刷によって作

- 4 -

成することが好ましい。

また酵素固定化膜は、酵素を含んだ感光性樹脂を用いたフォトリソグラフィ技術によって作成する。この場合、感光性樹脂としては、通常市販されているものを使用できる。例えばスチルバゾリウム残基を付加したポリビニルアルコール、ベンゾインエチルエーテルを重合開始剤とするポリエチレングリコールメタクリレートなどが挙げられる。

高分子膜は、光硬化性樹脂、あるいは二液性または一液性の常温硬化性樹脂で印刷、あるいは感光性樹脂で、フォトリソグラフィによって作成する。光硬化性樹脂、二液性または一液性樹脂、あるいは感光性樹脂を用いると、

- ① 印刷技術、フォトリソグラフィ技術を用いることができ、量産性および再現性が高い、
- ② 非溶媒系なので、酵素に対して安全である、という利点がある。

光硬化性樹脂としてはウレタンアクリレート、ポリエステルアクリレート、エポキシアクリレー

- 5 -

- 6 -

特開昭63-75552(3)

トが挙げられ、これに反応性希釈剤や光重合開始剤等を配合することができる。二液性の常温硬化性樹脂としてはイソシアネートとポリオールを配合したものや、エポキシ樹脂系、シリコン樹脂系等が挙げられ、これらの他にいずれも市販のものを使用できる。感光性樹脂としては、水または水を主成分とした現像液で現像できるものが好ましく、例えばポリビニルアルコール類、2-エチルヒドロキシメタクリレートとポリビニルアルコール、コロネートとポリエチレングリコールモノアクリレートとポリビニルアルコールを配合した感光性樹脂等を用いることができる。

本発明の酵素電極に用いられる酵素としては、グルコースオキシダーゼの他に通常酵素電極に使用されているものを使用でき、例えばグルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ビルベートオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、ウレートオキシダーゼ、アスコルベートオキシダーゼ、グリセロール

オキシダーゼ、乳酸オキシダーゼなどが挙げられる。

以下、本発明をさらに具体的に説明する。

本発明の酵素電極をグルコースセンサーに用いる場合を例に説明する。

電気絶縁性の基板の同一面上に、導電性インクを用いて作用極、対極および参照極の3極、あるいは陽極、陰極の2極による H_2O_2 電極を形成し、感応部に感光性樹脂を用いて酵素固定化膜を作成し、その上に光硬化性樹脂や二液性の非溶媒性の硬化性樹脂を硬化させて、オーバーコート膜である高分子膜を作成する。

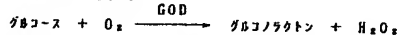
この場合、電極部を印刷技術で、また感応部の酵素固定化を印刷技術、あるいはフォトリソグラフィ技術を用いて作成することができるので、量産性が高い。また、オーバーコート膜により、グルコース、 H_2O_2 の拡散の安定化が計られ、十分な測定レンジが得られるため、被検液の希釈などの煩雑な操作の必要がないという利点がある。

また、オーバーコート膜の効果を考えると、例

- 7 -

えばオーバーコート膜がないポリビニルアルコール酵素固定化膜だけの場合、グルコース応答は8 mM (144 mg/dl) 程度しか得られない。

これは、次式：



で表されるグルコースオキシダーゼの反応において、溶液中の O_2 量および膜中への O_2 の拡散による供給量に限度があり、グルコースが過剰に供給された状態になれば、応答が飽和する。その量が、8 mM 程度である。

そこで、グルコースの透過量を減らし、ダイナミックレンジを上げるのがオーバーコート膜の1つの役目である。

さらに、ポリビニルアルコール膜は、吸水性があり、膨潤して電極への密着性が悪くなり、電極表面への H_2O_2 の拡散が変化し、応答電流の不安定化が生じる。オーバーコート膜はこのポリビニルアルコール膜の密着性を向上させる効果がある。

次に、本発明の簡易酵素電極の実施例を図面に基づき説明する。

- 9 -

- 8 -

(実施例)

第1図は、酵素電極を導電性インクによって作成した電極パターンを示す概略平面図である。

ポリエステル基板上に作用極1、対極2および参照極3を印刷し、耐水性電気絶縁体で感応部4と接点（外部接続部）5を分離する絶縁部を形成する。

第2図は、感応部の断面を示し、作用極1上に酵素を含んだ感光性樹脂による酵素固定化膜6、その上に二液性または一液性常温硬化性樹脂、光硬化性樹脂などによるオーバーコート膜7を形成する。

グルコースセンサに使用した場合、感応部上に被検液を滴下すると、被検液中のグルコースはオーバーコート膜によって拡散制限を受けて、グルコースオキシダーゼ固定化膜中に達し、そこで O_2 の存在のもとに、グルコノラクトンに変換され、 O_2 は H_2O_2 に還元される。その H_2O_2 を、作用極上で酸化する酸化電流から、あらかじめ求められている検量線（酸化電流対グルコース濃度）をもとに

- 10 -

特開昭63-75552(4)

して、グルコース濃度が算出される。この時、作用極には H_2O_2 酸化電位として、参照電極を基準として900mV(Ag/AgCl)を印加した。また、対極は電流供給のための極である。

また、バイオセンサーとして多項目化する場合には、本発明の酵素電極の感応部の作用極を複数化して、例えば、第3図に示したような電極において、作用極8にグルコースオキシダーゼ、作用極9にコレステロールオキシダーゼ、作用極10にウレートオキシダーゼの酵素固定化膜を用い、対極2および参照極3を設け、グルコース、コレステロールおよび尿酸を同時に測定することができる。

以下、実施例を更に具体的な材料および数字に基づき説明する。

実施例1

作用極の作成：

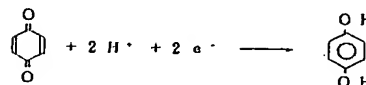
スチルバゾリウム残基を1.3mol%で付加したポリビニルアルコールの感光性樹脂11.0wt%の水溶液1g中に2.5mgのグルコースオキシダーゼを溶

かし、これを第2図の感応部作用極上に塗布し、乾燥した後330~490nmの近紫外線3mW/cm²の強度で5分間露光させた。さらに、その上にイソシアネートとポリオールを混合させた液を塗布し、24時間室温で硬化させ、ポリウレタン膜を形成した。

参照極の作成：

導電性カーボンインクで作成した2mm²の参照極上に、p-キノン0.2Mエタノール液を5μl塗布し、乾燥後、光硬化性ウレタンアクリレートを約20μmの厚みにして硬化させた。

p-キノン電極は、



の酸化還元電極反応で、pHに依存する。依存性は-59mV/pHであるが、血液の場合pHが7.35~7.45と安定しているので問題はない。時間安定性も50mV±5mV以内で、測定時間中は十分安定であ

- 1 1 -

る。このp-キノン電極のpH依存性を第4図に示す。

グルコースの検出：

このようにして作成した作用極および参照極を用い、作用極に850mV印加して、このグルコースセンサーのグルコース検量線求めた。その結果を第5図に示す。

これはpH7.2の0.1Mリン酸緩衝液中で、温度30℃において求めたものである。0.5mM(9mg/dl)から100mM(1800mg/dl)以上のグルコース濃度まで応答した。

実施例2

実施例1のポリビニルアルコールにグルコースオキシダーゼを固定化した膜上に、ウレタンアクリレート系光硬化樹脂(東亜合成化学、商品名アロニックスM1200とアロニックスM150を1:1に混合)を塗布し、3mW/cm²(330nm~490nm)の近紫外線を10分照射し、硬化させた。このグルコースセンサーも100mM(1800mg/dl)以上まで応答が得られた。

- 1 3 -

- 1 2 -

実施例3

実施例1のポリビニルアルコールにグルコースオキシダーゼを固定化した膜上に、シリコン系光硬化性樹脂(信越化学、商品名K-P601)を塗布し、3mW/cm²(330nm~498nm)の近紫外線を10分照射し、硬化させ、10μmの厚みに成膜した。このセンサーは、グルコース100mM(1800mg/dl)まで応答が得られた。

実施例4

この実施例では参照電極を除き、作用極と対極の2極法を用いた。実施例1と同様に感応部作用極上に、ポリビニルアルコール(スチルバゾリウム基)にグルコースオキシダーゼ2.5mg/g混合したものを、塗布し、近紫外線で硬化させ、酵素固定化膜を作成し、さらにその上にポリウレタン膜を形成した。作用極に、対極に対して900mVを印加し、実施例1と同様にグルコースの検量線求めた。その結果を第6図に示す。

このセンサーは、グルコース100mM(1800mg/dl)まで応答が得られた。

- 1 4 -

特開昭63-75552(5)

(発明の効果)

以上、本発明の酵素電極によれば、

- ① 電極部を導電性インクと絶縁レジストを用いて、印刷により簡単に作成できる、
 - ② 感応部の酵素固定化膜を、感光性樹脂オーバーコート膜と無溶媒の二液性または一液性硬化性樹脂、あるいは光硬化樹脂の印刷、フォトリソグラフィ技術を用いて容易に作成できる、
- という特徴を持ち、量産性が高く軽量化が可能なので簡易型の酵素センサーに組み込むことができ、オーバーコート膜によりグルコースなどの酵素の透過制限と、酵素固定化膜の密着性の向上による応答の安定化が得られる結果、応答レンジが広くなり、例えばグルコースでは100mM (1800mg/dl) 以上まで可能となった。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の実施例による電極パターンを示す概略平面図、

第2図は第1図の感応部を示す断面図、

第3図は本発明を多項目化した酵素電極に使用

した例を示す概略断面図、

第4図は本発明実施例に使用するp-キノン電極のpH依存性を示すグラフ、

第5図は本発明実施例1によるグルコースセンサーのグルコース検量線を示すグラフ、

第6図は本発明実施例4によるグルコースセンサーのグルコース検量線を示すグラフである。

- 1……作用極、 2……対極、 3……参照極、
4……感応部、 5……接点、 6……酵素固定化膜、
7……オーバーコート膜、
8～10……作用極。

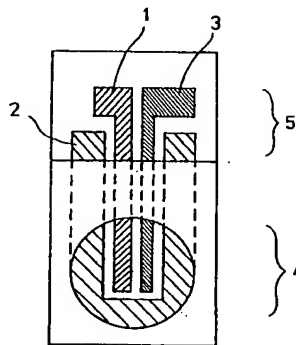
特許出願人 株式会社タケダメディカル
代理人 弁理士 舟橋 榮子



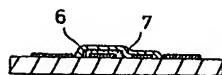
- 15 -

- 16 -

第1図

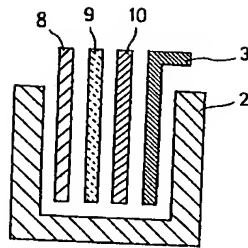


第2図

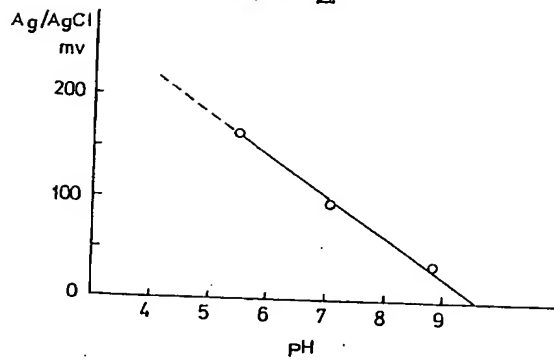


特開昭63-75552(6)

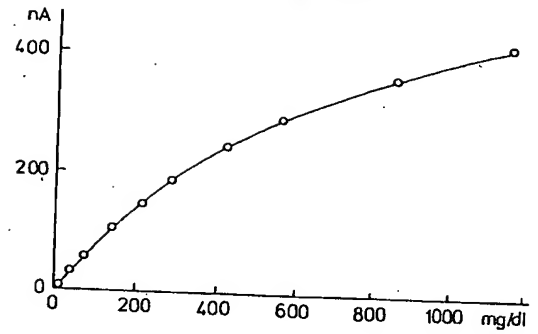
第 3 図



第 4 図



第 5 図



第 6 図

